Rev. Acad. Canar. Cienc., XXII (Núm. 3), 11-35 (2010) (publicado en octubre de 2011)

LAURENCIA DENDROIDEA (CERAMIALES, RHODOMELACEAE) EN CANARIAS. I. ESTUDIO PRELIMINAR QUÍMICO

M. Machín-Sánchez[1], M.ª L. Souto[2], E. Aylagas[1] & M. C. Gil-Rodríguez[1]

[1] Departamento de Biología Vegetal (Botánica). Universidad de La Laguna
38071 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias. mmchin@ull.es
[2] Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González". Universidad de La Laguna
Astrofísico Francisco Sánchez 2. 38206 La Laguna, Tenerife, Islas Canarias

RESUMEN

Las algas rojas del género *Laurencia* destacan en el campo de los productos naturales por la producción de novedosos metabolitos secundarios halogenados, de naturaleza terpénica y no terpénica. Estos compuestos están relacionados con la defensa química natural de las mismas, siendo por tanto de interés biotecnológico.

Este trabajo aborda el estudio químico preliminar de *Laurencia dendroidea*, aislándose dos sesquiterpenos cíclicos halogenados que aunque ya conocidos, demostraron poseer actividad antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales humanas.

Palabras clave: Algas, Canarias, *Laurencia dendroidea*, Rhodophyta, sesquiterpenos cíclicos halogenados.

ABSTRACT

The red seaweeds of *Laurencia* genus are characterized by the production of natural products leading new secondary halogenated metabolites, either terpenic or non terpenic. These substances are related with natural algae defences, which result in a high biotechnological interest.

In this paper, we made the preliminary chemical study of *Laurencia dendroidea*. Two known cyclic halogenated sesquiterpens were isolated, which showed antiproliferative activity against those cellular lines proved.

Key words: Seaweeds, Canary Islands, Cyclic halogenated sesquiterpenes, *Laurencia dendroidea*, Rhodophyta.

1. INTRODUCCIÓN

Las algas rojas del complejo *Laurencia* están siendo ampliamente estudiadas, tanto desde el área de la taxonomía como de la química. Este interés se debe a dos factores principales. En primer lugar, muestran una alta diversidad específica, estando representadas por

aproximadamente 180 especies [17] distribuidas en los mares tropicales, subtropicales y templados de todo el mundo [29]. Hoy en día el complejo *Laurencia* está integrado por cinco géneros distintos, definidos en base a evidencias morfológicas y moleculares: *Laurencia sensu estricto* [22], *Osmundea* Stackhouse [34], *Chondrophycus* (Tokida & Saito) [14], *Palisada* (Yamada) Nam [32, 33] y *Yuzurua* Martin-Lescanne *et al.,* [27].

En segundo lugar, estas macroalgas marinas constituyen una importante fuente natural de metabolitos secundarios halogenados específicos, con características estructurales y propiedades farmacológicas únicas, para los que se han descrito entre otras, actividad citotóxica, antitumoral y bactericida [43]. Por esta razón, se consideran buenos candidatos para su aplicación en el campo de la biotecnología médico-farmacéutica. El uso de herramientas químicas en el estudio de las algas del complejo *Laurencia,* además de permitir la identificación de nuevas sustancias activas con potencial farmacológico [1], puede contribuir, por medio de aproximaciones quimiotaxonómicas, a la ordenación de las especies del complejo y a la caracterización de sus poblaciones.

Actualmente, se ha realizado el estudio químico de más de 60 especies del género *Laurencia* y unos 600 compuestos halogenados distintos han sido elucidados. La síntesis y/o almacenamiento de dichos metabolitos secundarios tiene lugar en los *corps en cerise*, inclusiones citoplasmáticas de las células corticales presentes sólo en aquellas especies productoras de compuestos halogenados [42, 43, 44, 45]. Éstos, de acuerdo con su origen biogénico, se reúnen principalmente en moléculas de naturaleza terpénica y no terpénica. Entre los terpenos, los más abundantes son los sesquiterpenos, mientras que el grupo de los no terpénicos está liderado por C_{15} acetogeninas [13, 42, 43]. En la actualidad se siguen elucidando novedosas y prometedoras estructuras de compuestos halogenados presentes en las especies de *Laurencia* [1], sustancias que junto con otras muchas de origen marino han abierto, en la última década, nuevas líneas de investigación en el campo de la biotecnología (industria médico-farmacéutica, cosmética, nutricional, agroquímica, etc.).

En este trabajo abordamos el estudio químico preliminar de *Laurencia dendroidea* (Hudson) Lamouroux, taxon que había sido confundido, en Canarias, con *L. majuscula* (Harvey) Lucas [4, 26]. De ella se han aislando dos sesquiterpenos cíclicos halogenados que aunque ya conocidos, demostraron poseer actividad antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales humanas.

2. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Estudio de sesquiterpenos cíclicos halogenados implicados en la defensa química de *Laurencia.*

Las investigaciones químicas del género *Laurencia* realizadas para determinar la naturaleza de metabolitos secundarios, comenzaron con Obata & Fukushi [36], en un estudio sobre el aceite esencial del alga *Laurencia glandulifera* Kützing. Los resultados reflejaron que el grupo de metabolitos secundarios mayoritario era el de los sesquiterpenos [36]. Desde entonces, en el campo de investigación de los productos naturales de origen marino, las macroalgas del género *Laurencia* constituyen un taxón de gran importancia, al ser capaces de producir una notable variedad de metabolitos secundarios, en su mayoría halogenados.

Las especies del género *Laurencia* que poseen *corps en cerise* en sus células corticales externas son las únicas, dentro del complejo *Laurencia*, en las que se ha constatado la existencia de estos compuestos polihalogenados [11, 42, 43, 44, 45]. La riqueza de estas sustancias específicas y su biosíntesis ha despertado especial interés debido, a que los terpenos en sí mismos, son precursores de muchos metabolitos bioactivos. La familia de enzimas vanadium haloperoxidasas podría ser la responsable de la reacción de ciclación de dichos compuestos, ya que enzimas de esta naturaleza han sido aisladas a partir de algas productoras de terpenos cíclicos halogenados [3, 48]. Un ejemplo de ello es el aislamiento de vanadium bromoperoxidasa (V-BrPO) a partir de extractos de *Laurencia pacifica* Kylin, llevado a cabo por Carter-Franklin *et al.* [6, 7]. En estos trabajos se demuestra la acción catalítica de V-BrPO y su implicación en la bromación y ciclación de monoterpenos como el geraniol y el nerol, los cuales originan estructuras cíclicas que son encontradas en numerosos metabolitos terpenos bromocíclicos marinos. Por lo tanto, parecen existir evidencias del papel catalítico de V-BrPO en la biosíntesis de los sesquiterpenos cíclicos bromados presentes en las algas rojas [7], aunque la estructura de esta enzima en las algas del género *Laurencia* no ha sido caracterizada [43].

Actualmente, numerosos investigadores se esfuerzan en conocer la función, la dinámica de producción y almacenaje de los productos naturales polihalogenados contenidos en los *corps en cerise*. Muchos de estos compuestos poseen entre otras, propiedades insecticidas [10, 12], actividad antibacteriana [5, 20, 45] y actividad repelente de herbívoros [18, 21, 37]. Todas estas características llevan a su calificación como metabolitos secundarios específicos destinados a la defensa química natural de *Laurencia.* Por ello, son buenos candidatos en el campo de la biotecnología médico-farmacéutica.

Un caso interesante de metabolito sesquiterpénico cíclico halogenado con actividad biológica es el elatol que se aisló por primera vez en 1974 a partir de *Laurencia elata* (C. Agardh) Hooker & Harvey [41]. Desde su elucidación, ha sido aislado en numerosas ocasiones y muchas veces, de forma mayoritaria, a partir de otras especies de *Laurencia* como *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux [2, 37, 39], *Laurencia majuscula* (Harvey) Lucas [11, 28, 44, 46, 47], *Laurencia rigida* J. Agardh [9], *Laurencia microcladia* Kützing [25] y *Laurencia cartilaginea* Yamada [19].

Recientemente, un trabajo de Salgado *et al.* [39] sobre compartimentación celular, transporte y exocitosis de compuestos halogenados aislados del alga *L. obtusa*, sentó bases sólidas para explicar la producción mayoritaria del elatol y su posible significado ecológico. El estudio evidencia el papel que juega el cloroplasto en la síntesis de los compuestos halogenados dependiente de la actividad de haloperoxidasas. También plantea la existencia de fenómenos de transporte específico de pequeñas vesículas cargadas de dichos metabolitos hacia los *corps en cerise,* dirigidas por microfilamentos de actina y de miosina no convencionales. Además, sugiere un mecanismo de exudación del elatol hacia el medio externo, mediado por vesículas que viajan desde los *corps en cerise* hacia las paredes de las células corticales externas. Esta liberación tendría como objetivo la eliminación de los microepífitos localizados en el talo o bien, la repulsión de los potenciales depredadores. Así, se explicaría el papel del elatol en la defensa química del alga [poder antifouling, inhibición del establecimiento del bivalvo *Perna perna* [8], papel repelente frente a determinados herbívoros [16, 18, 37]]. Por último, en este trabajo revelan igualmente un proceso de degradación de los *corps en cerise* y consecuente liberación intracelular de altas concentraciones de compuestos halogenados. Este fenómeno lo relacionan con procesos de muerte celular programada, evento ya descrito en *Dunaliella tertiolecta* Butcher (Chlorophyceae, Volvocales) [40]

y en *Volvox carteri* (Chlorophyceae, Volvocales) [35] como mecanismo alternativo en respuesta al incremento en el nivel de estrés ambiental [39].

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, queda patente la aplicación e interés que este tipo de sustancias pueden tener en diferentes campo de las ciencias.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección y estudio preliminar de las muestras

Las muestras de *Laurencia dendroidea* se recolectaron manualmente, durante la bajamar, en diferentes localidades de las islas del Archipiélago Canario; en costas expuestas al oleaje, sobre sustratos rocosos del eulitoral inferior o en los primeros metros del sublitoral. Los ejemplares fueron transportados en neveras desde el punto de muestreo hasta el laboratorio. Alrededor de 1.2 Kg de algas frescas libres de macroepífitos, recolectadas en el Puerto de la Cruz (Tenerife), en septiembre de 2009, fueron congeladas y destinadas al estudio preliminar de sus metabolitos secundarios. Los ejemplares que se utilizaron para identificar el taxon fueron prensados e incluidos en el Herbario TFC (Tenerife Ciencias, Universidad de La Laguna).

Estudio químico

Extracción: Una vez se descongelaron, las algas fueron sometidas durante cinco días a un proceso de maceración a temperatura ambiente, inmersas en una mezcla $CHCl_3$:MeOH (1:1). Tras este tiempo se obtuvo un primer extracto orgánico de color verde oscuro que pesó 30.71 g, el cual se identificó como **M-1**. Aproximadamente 60.72 g de residuos de algas, una vez secos y triturados, fueron sometidos a una segunda maceración en un Soxhlet con CH_2Cl_2. Se obtuvo un segundo extracto M-2 que fue debidamente conservado en frío, esperando a un posterior análisis. La eliminación de los disolventes, en todos los casos, se consiguió empleando evaporadores rotatorios Büchi R-200®, equipados con un baño maría a 37ºC y bombas de vacío Büchi B-721®.

Marcha cromatográfica del extracto M-1: El extracto **M-1** (Fig. 1) de *Laurencia dendroidea* fue en primer lugar, separado por cromatografía de exclusión molecular en porciones aproximadas de 10 g, haciendo uso de una columna abierta de Sephadex LH-20 de SIGMA® (600 x 70 mm Ø) como fase estacionaria y una mezcla de $CHCl_3$:MeOH (1:1) como eluyente o fase móvil. Esta técnica cromatográfica permitió la separación de los compuestos con distintos tamaños moleculares, los cuales eluyen por la columna en orden decreciente. Este proceso se monitoreó por cromatografía en capa fina (TLC) en *n*-Hex:Acetona (7:3), utilizando placas cromatográficas de gel de sílice 60 G y H de la casa Merck® que fueron reveladas primero, por visualización de las mismas expuestas a radiación ultravioleta (λ=254 nm) en un gabinete Spectroline® modelo CM-10 y segundo, por pulverización con una solución al 4% de ácido fosfomolíbdico en etanol y posterior calentamiento a 140ºC. Las fracciones que presentaron un mismo comportamiento en TLC fueron reunidas, obteniéndose finalmente cinco nuevas fracciones: M-1A, M-1B, M-1C, **M-1D** y M-1E. La eliminación de los disolventes se consiguió empleando los evaporadores rotatorios anteriormente descritos.

Posteriormente, todas las fracciones fueron sometidas a técnicas espectroscópicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se llevó a cabo para cada una un experimento de ^1H,

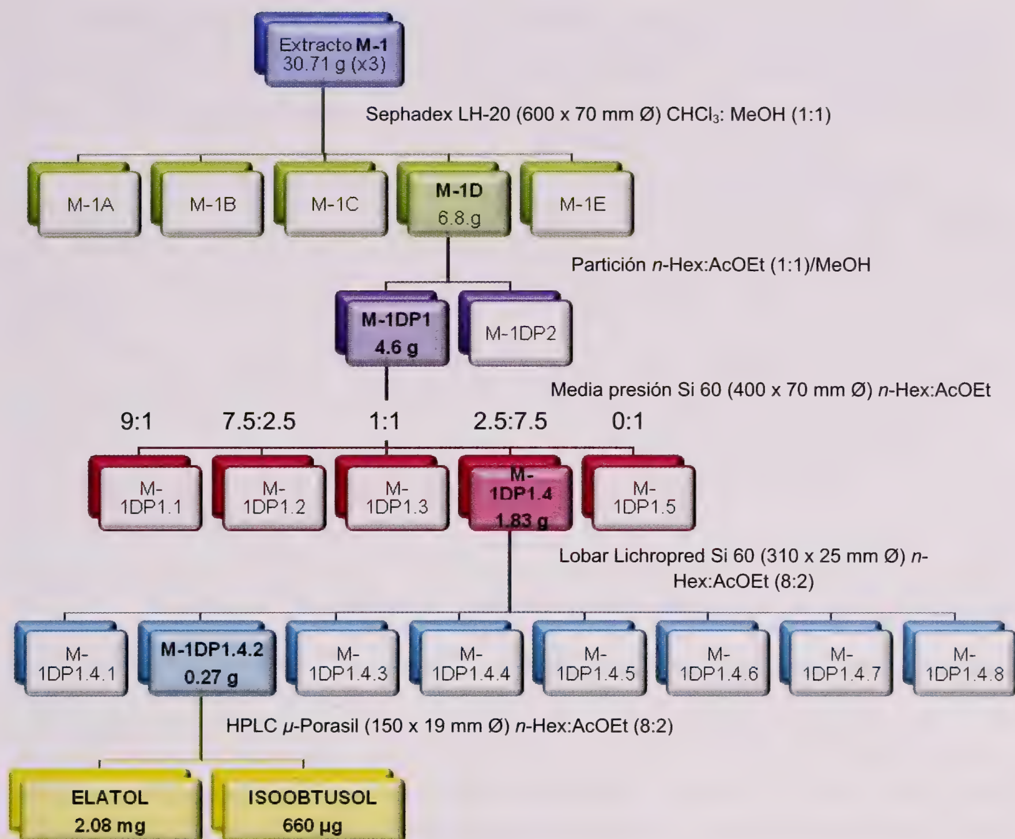


Figura 1.- Marcha cromatográfica para el extracto M-1.

en un espectrómetro BRUKER® AVANCE 500 MHz, desarrollado con los programas adquiridos desde la casa BRUKER. Pruebas para las que fueron necesarias la dilución de las fracciones problema en $CDCl_3$ (99.9%) y en las que se tomó como referencia interna la señal de $CHCl_3$ residual para ^1H 7.26 ppm. Los datos obtenidos del espectrómetro fueron procesados por el programa MestReC Nova (V 4.8.6.0). El examen de las señales en los diferentes espectros de RMN de ^1H llevó a la elección de la fracción **M-1D**.

Estudio de la fracción M-1D: La fracción **M-1D** pesó 6.8 g; ésta fue sometida a una partición debido a la disparidad en el carácter polar de los compuestos contenidos. La partición se realizó, separando primero los compuestos solubles en una mezcla de *n*-Hex:AcOEt (1:1), **M-1DP1**; y posteriormente, aquellos compuestos muy polares y solubles en MeOH, M-1DP2. Esta última fracción se reservó para un futuro análisis. La separación de **M-1DP1** se efectuó por cromatografía de fase normal en columna abierta de gel de sílice Kieselgel 9385 Merck® (400 x 70 mm Ø) utilizando por gravedad como eluyente, sistemas de polaridad creciente. Se empleó por tanto, como fase móvil, una mezcla *n*-Hex:AcOEt en las siguientes proporciones: (9:1), (7.5:2.5), (1:1), (2.5:7.5) y (100% AcOEt). Para que tuviera

lugar una buena separación de los compuestos, la relación peso muestra/peso de gel de sílice fue como mínimo de 1/200. Su monitoreo se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC) en *n*-Hex:AcOEt (1:1), estableciéndose cinco nuevas fracciones. El estudio posterior de las señales, de los diferentes espectros de RMN de ^{1}H de cada una de las cinco fracciones, permitió escoger la fracción **M-1DP1.4**.

Estudio de la fracción M-1DP1. 4: 1.83 g de **M-1DP1.4** se sometieron a una cromatografía en columna de media presión fase normal, usando una columna pre-empaquetada Lobar Lichropred® Si 60 (310 x 25 mm Ø) y *n*-Hex:AcOEt (8:2) como fase móvil. Una bomba FLUID METERING modelo RP-SY sirvió para la circulación de los disolventes y de la muestra. Posteriormente, tras el habitual monitoreo por cromatografía en capa fina (TLC) en *n*-Hex:AcOEt (8:2), resultaron ocho fracciones. El análisis de los diferentes espectros de RMN de ^{1}H de cada una de las ocho fracciones, mostró en **M-1DP1.4.2**, señales características de compuestos de naturaleza terpénica, lo que centró el interés por esta última fracción.

Estudio de la fracción M-1DP1. 4.2: La purificación final se consiguió a través de un sistema de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), marca LKB®, usando una columna preparativa de fase normal μ-Porasil (150 x 19 mm Ø) de WATERS®, en *n*-Hex:AcOEt (8:2) y flujo de 1mL/min; condiciones que permitieron la obtención de dos metabolitos, compuestos 1 y 2, que posteriormente fueron elucidados por métodos espectroscópicos resultando ser los sesquiterpenos conocidos como: **elatol** e **isoobtusol**.

Elucidación estructural de los metabolitos aislados

Resonancia Magnética Nuclear: La elucidación estructural de ambos compuestos se realizó fundamentalmente, por medio de la ejecución de experimentos de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) que se llevaron a cabo en espectrómetros BRUKER® AVANCE 500MHz y 600MHz, en función de las necesidades particulares de cada molécula. Experimentos ^{1}H, ^{13}C, COSY, HSQC, HMBC y ROESY desarrollados con los programas adquiridos desde la casa BRUKER. Pruebas para las que fueron necesarias la dilución del compuesto problema en $CDCl_3$ (99.9%) y, en las que se tomó como referencia interna la señal de $CHCl_3$ residual para ^{1}H y ^{13}C, 7.26 ppm y 77.2 ppm, respectivamente. Los datos obtenidos del espectrómetro fueron procesados por el programa MestReC Nova (V 4.8.6.0).

Absorción en el infrarrojo: El experimento de infrarrojo para cada compuesto fue realizado en un espectrofotómetro FT-IR BRUKER®, modelo IFS-55 (F.T.I.R.). El espectro fue registrado empleando una disolución del producto en $CHCl_3$ seco sobre una pastilla de NaCl.

Rotación óptica: La actividad óptica de cada compuesto fue medida en un polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, a 20 °C, usando la línea D del sodio (λ=589 nm). Los productos fueron disueltos en $CHCl_3$ seco; se empleó una celda con 1dm de longitud óptica.

Espectrometría de masas: Los espectros de masas fueron realizados en un espectrómetro VG-Autospec FISONS®.

Datos físicos del elatol: Aceite incoloro; $[\alpha]^{25}_{D}$= +86.5 (*c* 0.21, $CHCl_3$); IR ν_{max} ($CHCl_3$): 3476, 3090, 2951, 1646, 1434, 1343, 1210, 1089 y 1033 cm^{-1}; RMN ^{13}C (150 MHz) y ^{1}H (600 MHz) en $CDCl_3$, ver tabla 1; HRMS *m/z*: 334.0516/332.0537 (calc. 334.0513/332.0543, $C_{15}H_{22}O^{79}Br^{37}Cl/C_{15}H_{22}O^{79}Br^{35}Cl$, $[M^{+}-H]$), 299.0779/297.0849 (calc. 299.0834/297.0854, $C_{15}H_{22}O^{81}Br/C_{15}H_{22}O^{79}Br$, $[M^{+}-Cl]$), 253.0967 (calc. 253.0940, $C_{15}H_{21}O^{35}Cl^{37}Cl$, $[M^{+}-Br]$), 235.1247 (calc. 235.1254, $C_{15}H_{20}{}^{35}Cl$, $[M^{+}-Br-OH]$).

Datos físicos del isoobtusol: Aceite incoloro; $[\alpha]^{25}_{D}$= +69.7 (*c* 0.07, $CHCl_3$); IR ν_{max} ($CHCl_3$): 3415, 3089, 2928, 1636, 1450, 1246 y 1067 cm^{-1}; RMN ^{13}C (150 MHz) y ^{1}H (600 MHz) en $CDCl_3$, ver tabla 2; HRMS *m/z*: 415.9748/413.9760/411.9776 (calc. 415.9754/413.9775/411.9804, $C_{15}H_{23}O^{81}Br_2{}^{35}Cl$/$C_{15}H_{23}O^{79}Br_2{}^{37}Cl$/ $C_{15}H_{23}O^{79}Br_2{}^{35}Cl$ [M^+-H]), 394.9673 (calc. 394.9600, $C_{15}H_{20}{}^{81}Br^{79}Br\ {}^{35}Cl$ [M^+-H_2O].

Ensayos de bioactividad del elatol e isoobtusol frente a líneas celulares tumorales: Los ensayos de inhibición de crecimiento celular de los compuestos aislados frente a varias líneas celulares de tumores sólidos, fueron llevados a cabo por el personal del Laboratorio de Bioensayos (BioLab) del Instituto Universitario de Bio-orgánica "Antonio González".

Cultivo de células tumorales: Las líneas celulares seleccionadas para el desarrollo de los ensayos de bioactividad fueron líneas de tumores sólidos A2780 (ovario), HBL-100 (mama), HeLa (cerviz), ISHIKAWA (endometrio), SW1573 (pulmón) y WiDr (colon). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con un suplemento de suero fetal bovino inactivo (5%) y L-glutamina (2 mM), utilizando un incubador a 37 ºC en atmósfera con 5% de CO_2 y una humedad del 95%.

Ensayo de viabilidad/ toxicidad: Los ensayos se realizaron empleando el método de sulforodamina B (SRB) del NCI (Storeng *et al.,* 1990) con pequeñas modificaciones. Las células tumorales se cultivaron en monocapa en placas de 96 pocillos. Los compuestos aislados fueron disueltos en DMSO a 400 veces la concentración máxima de ensayo, 25 μM. Los pocillos control fueron expuestos a una cantidad equivalente de DMSO (0,25% v/v). Cada compuesto fue ensayado por triplicado con concentraciones dentro del rango entre 1 y 25 μM. Transcurrido el tiempo de incubación de las células expuestas a los compuestos de interés (48 horas) éstas fueron precipitadas en frío con 25 μl de ácido tricloroacético al 50% (p/v) y fijadas durante 60 minutos a 4 ºC. A continuación, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico con sulforodamina B (SRB). Las células fijadas se tiñeron durante 15 min con 25 μL de una disolución de SRB al 0.4% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). El exceso de colorante se eliminó tras 3-4 lavados con una disolución de ácido acético al 1% (v/v). Los pocillos se secaron y el colorante se disolvió con 150 μL de una disolución de Tris base 10mM en agua miliQ. La densidad óptica de cada pocillo fue medida a 492 nm utilizando un lector de microplacas [(PowerWave™ XS) (Bio-Tek® Instruments, Inc.)]. A los valores de absorbancia se les aplicó una corrección de fondo cuantificada en los pocillos que solo contienen medio de cultivo. El porcentaje de crecimiento para cada concentración de compuesto empleado se calculó con respecto a los pocillos control, a partir de la diferencia de densidad óptica al inicio y al final del tiempo de exposición al compuesto. Finalmente, la actividad biológica se expresó en términos de GI_{50} (concentración inhibitoria del 50%)

Efecto sobre el ciclo celular: Los cambios relacionados con el ciclo celular se estudiaron por medio de citometría de flujo en las líneas celulares HBL-100 (mama), SW1573 (pulmón) y WiDr (colon). Las células cultivadas (10^5-10^6 células/muestra) fueron expuestas a tiempos variables y a dosis crecientes de ambos compuestos a partir de los valores de GI_{50}. Tras la exposición se incubaron con ioduro de propidio (0.5% p/v). La distribución del contenido de ADN se midió en al menos 25000 células/muestra, siendo posible de este modo determinar si los compuestos aislados eran capaces de inducir arresto y en qué fase del ciclo estaba teniendo lugar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elucidación estructural

Compuesto 1: elatol

El compuesto 1 fue aislado como un aceite incoloro, $[\alpha]^{25}_{D}$= +86.5 (*c* 0.21, $CHCl_3$) y una fórmula molecular de $C_{15}H_{22}OBrCl$, que fue propuesta a partir del estudio por RMN y confirmada a través de espectrometría de masas. De este modo, en el análisis del espectro de masas de alta resolución se observan dos picos isotópicos principales a *m/z* 334.0516/332.0537 (calc. 334.0513/332.0543), que corresponden al ion molecular, así como los relativos a las fragmentaciones por pérdida de agua, cloro y bromo.

El espectro de RMN ^{13}C del compuesto 1 (Fig. 2) muestra señales correspondientes a carbonos de distinta naturaleza: tres metilos a δ_C 19.5, 20.8 y 24.3; cinco metilenos, uno de ellos olefínico a δ_C 25.6, 29.4, 38.0, 38.6 y 116.0; dos metinos en α a heteroátomos a δ_C 70.9 y 72.2; así como cinco carbonos no protonados, uno espiro y tres de ellos tipo sp^2, a δ_C 43.2, 49.2, 124.2, 128.1 y 140.8 (Tabla 1). A partir de estos datos se deduce que de los cuatro grados de insaturación implicados en la fórmula molecular, dos son debido a átomos de carbono tipo sp^2 (dos dobles enlaces), mientras que, al poseer el resto de los átomos de carbono presentes en la molécula hibridación sp^3, los dos grados de insaturación restantes sólo se justifican por la existencia de dos ciclos en la estructura, ciclos que deben de encontrarse unidos a través del carbono cuaternario espiránico a δ_C 49.2. Estas características estructurales permiten simplificar el análisis estructural a través de RMN por sistemas de anillos.

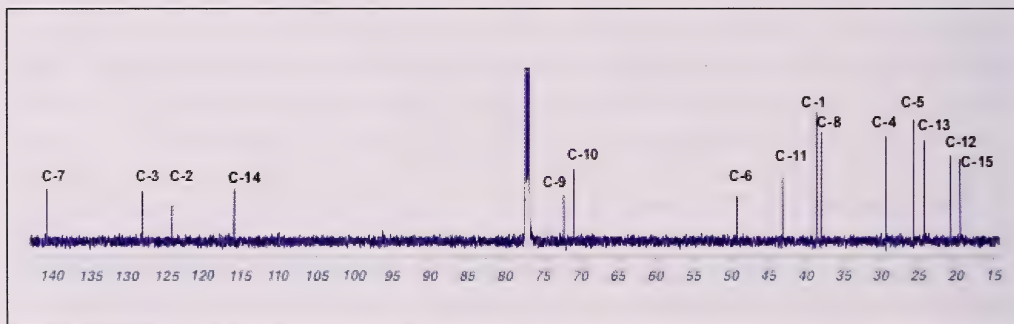


Figura 2.- Espectro RMN ^{13}C del compuesto 1.

Determinación del anillo A

La determinación del *anillo A* se inicia con el análisis del espectro de RMN ^{1}H (Fig. 3), centrando la atención en los dos singletes localizados a δ_H 1.10 (H_3-12) y 1.11 (H_3-13) que integran para 6 hidrógenos. Señales que indican la presencia de dos grupos metilo, cada uno con sus tres protones equivalentes que, dada su multiplicidad, están situados sobre carbonos totalmente sustituidos.

El desplazamiento químico de carbono de cada metilo se determina por medio del experimento HSQC (Fig. 4), espectro bidimensional que refleja los acoplamientos de ambas señales de protón con sus carbonos correspondientes, siendo el valor de las mismas δ_C 20.8 (C-12) y 24.3 (C-13), respectivamente.

nº C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplicidad	*J* (Hz)
1	38.6	2.40/2.62	d/d	17.3/17.3
2	124.2			
3	128.1			
4	29.4	1.84/1.99	m/m	
5	25.6	1.66/1.86	m/m	
6	49.2			
7	140.8			
8	38.0	2.54/2.66	dd/dd	2.6;14.6/2.9;14.6
9	72.2	4.18	ddd	3.1, 3.1, 3.1
10	70.9	4.65	d	2.9
11	43.2			
12	20.8	1.10	s	
13	24.3	1.11	s	
14	116.0	4.84/5.17	bs/bs	
15	19.5	1.73	s	

Tabla 1.- Datos de RMN del compuesto 1 ($CDCl_3$).

El estudio del acoplamiento ^1H-^{13}C de estas señales a dos y tres enlaces en el experimento de HMBC muestra la conectividad de cada señal de protón de metilo con el carbono del otro metilo singlete, y además la correlación de ambos metilos con los carbonos cuaternarios situados a δ_C 43.2 (C-11) y 49.2 (C-6), así como con el carbono de un grupo metino unido a heteroátomo localizado a δ_C 70.9 (C-10).

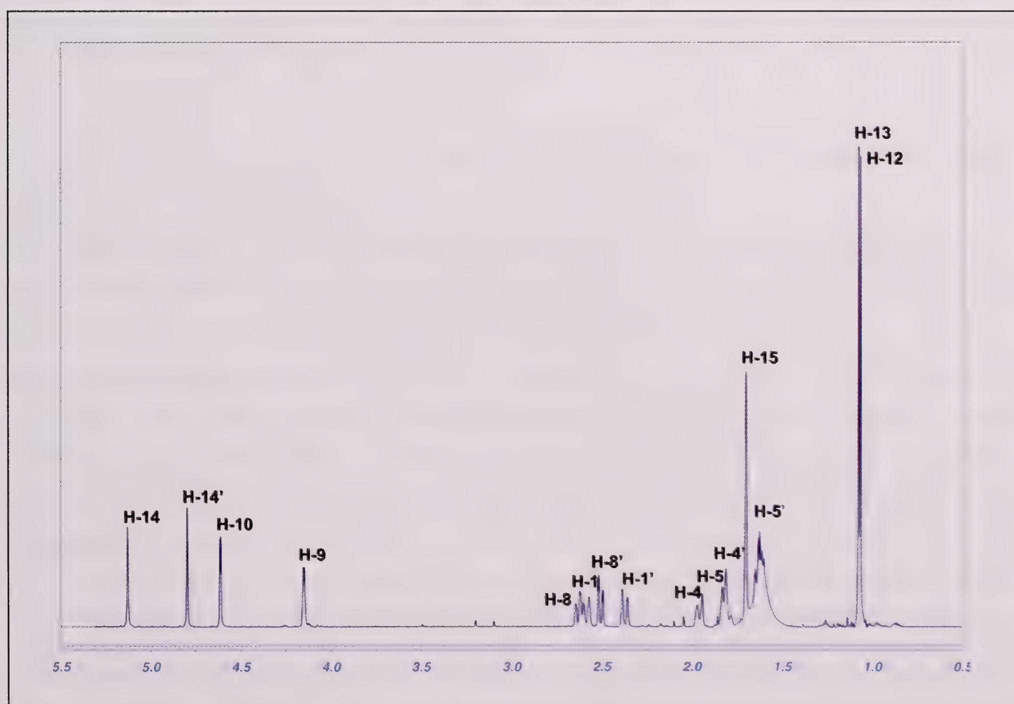


Figura 3.- Espectro RMN ^1H del compuesto 1.

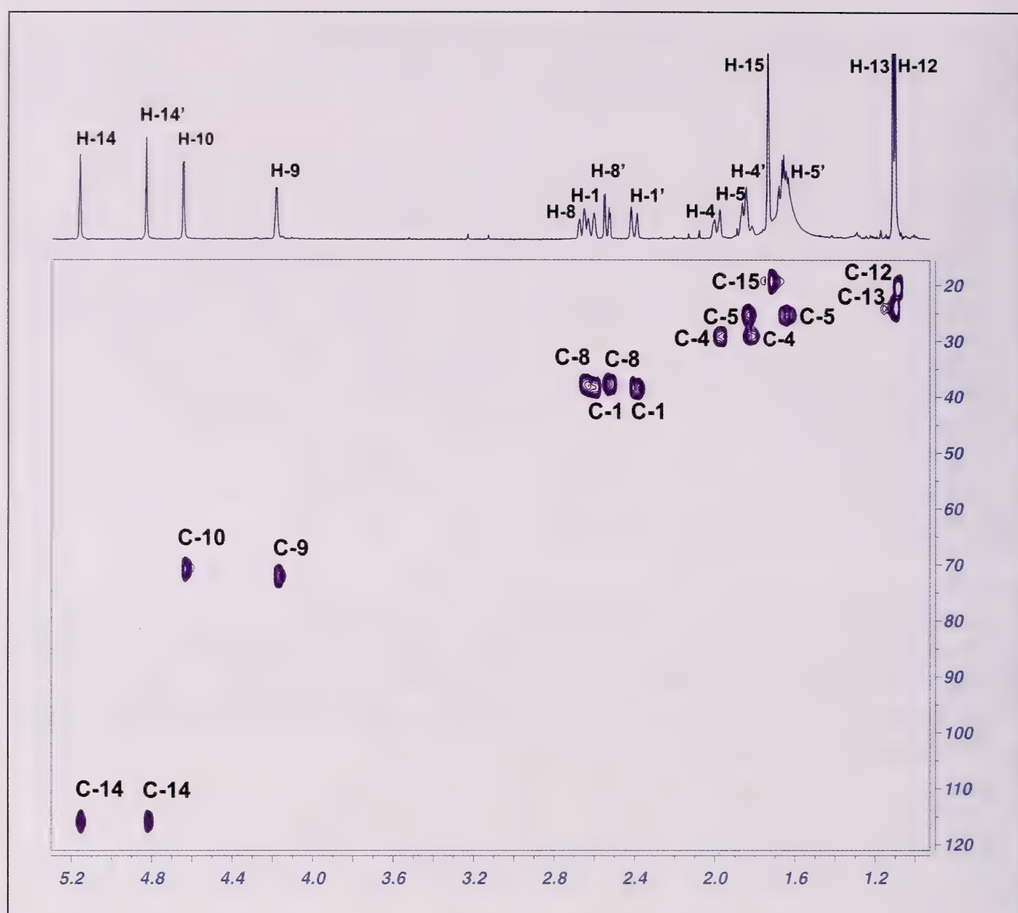


Figura 4.- Experimento HSQC del compuesto 1.

Estos datos reflejan que ambos metilos son metilos geminales, situados sobre un mismo carbono completamente sustituido, carbono que a su vez, está flanqueado por el carbono cuaternario espiro y por un metino sobre heteroátomo (Fig. 5).

Continuando la elucidación estructural del *anillo A,* a partir del metino C-10, se puede determinar que a este grupo por el experimento de HSQC, le corresponde la señal que integra para un solo protón a δ_H 4.65 (H-10) (Fig.4). El estudio de la misma y sus conectividades ^1H-^1H en el experimento COSY lleva a la definición de un primer sistema spin (Fig. 6): el hidrógeno centrado a δ_H 4.65 se encuentra acoplado con el metino a δ_H 4.18 (H-9) y éste a su vez con los protones a δ_H 2.54/2.66 de un grupo metileno (H_2-8); estableciendo así el *fragmento 1*: δ_H 4.65 (H-10) ↔ δ_H 4.18 (H-9) ↔ δ_H 2.54/2.66 (H-8'/H-8). A través del experimento HSQC se asigna a cada protón su carbono: C-10 a δ_C 70.9, C-9 a δ_C 72.2 y C-8 a δ_C 38.0.

Los acoplamientos HMBC a larga distancia entre los protones del metileno H_2-8 y los carbonos, a dos y tres enlaces, completan la asignación del *anillo A*, pues descubren el acoplamiento a dos enlaces con un carbono cuaternario olefínico a δ_C 140.8 (C-7); también, a larga distancia con un carbono de doble enlace exocíclico a δ_C 116.0 (C-14) y además, con el carbono totalmente sustituido anteriormente establecido C-6. (Fig. 7).

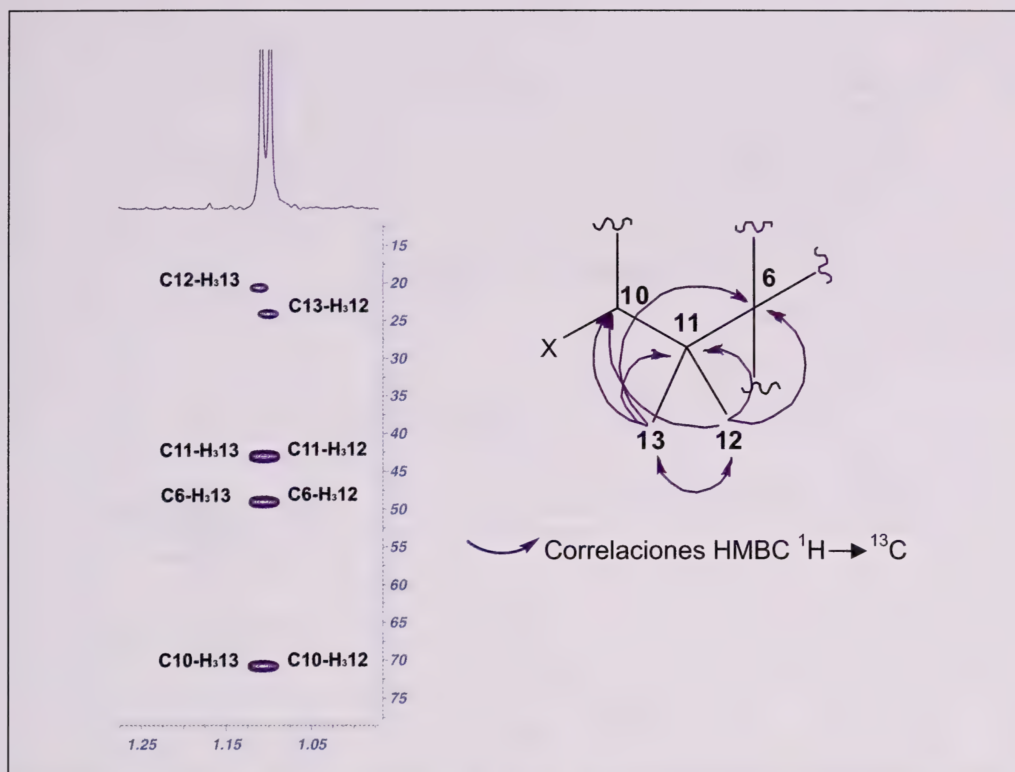


Figura 5.- Sección del experimento HMBC del compuesto 1, región 1.05< δ_H<1.25, 15< δ_C<75 ppm. Dibujo de las principales correlaciones HMBC observadas.

Finalmente, a través del experimento de HSQC se identifica los desplazamientos de protón del metileno exocíclico C-14 correspondiendo a las dos señales de mayor desplazamiento químico en el espectro de protón, señales que aparecen como singletes anchos a δ_H 4.84 y 5.17. (Fig. 4). De esta forma se genera un anillo de ciclohexano cuyas características principales son la presencia de un doble enlace exocíclico en la posición C-7, la existencia de dos heteroátomos en C-9 y C-10, y de un *gem*-dimetilo en C-11.

Determinación del anillo B

La determinación del segundo anillo presente en el compuesto 1 comienza convenientemente por el análisis de los acoplamientos a larga distancia del HMBC, a partir del carbono espiro común a ambos sistemas de anillos, el carbono C-6. De este modo, se observan acoplamientos de C-6 con los protones diasterotópicos de dos metilenos, a δ_H 2.40/2.62 y 1.66/1.86, respectivamente (Fig. 8).

El análisis del espectro COSY para los protones anteriores desvela que, el primer metileno aparece como un sistema aislado (H-1'/H-1), mientras que el segundo se acopla con un nuevo metileno a δ_H 1.84/1.99 constituyendo así otro sistema de spin o *fragmento 2* (Fig. 9): δ_H1.66/1.86 (H-5'/H-5) ↔ δ_H 1.84/1.99 (H-4'/H-4). La asignación de cada uno de sus carbonos se completa por medio de las correlaciones de HSQC correspondientes a δ_C 38.6 (C-1), 25.6 (C-5) y 29.4 (C-4).

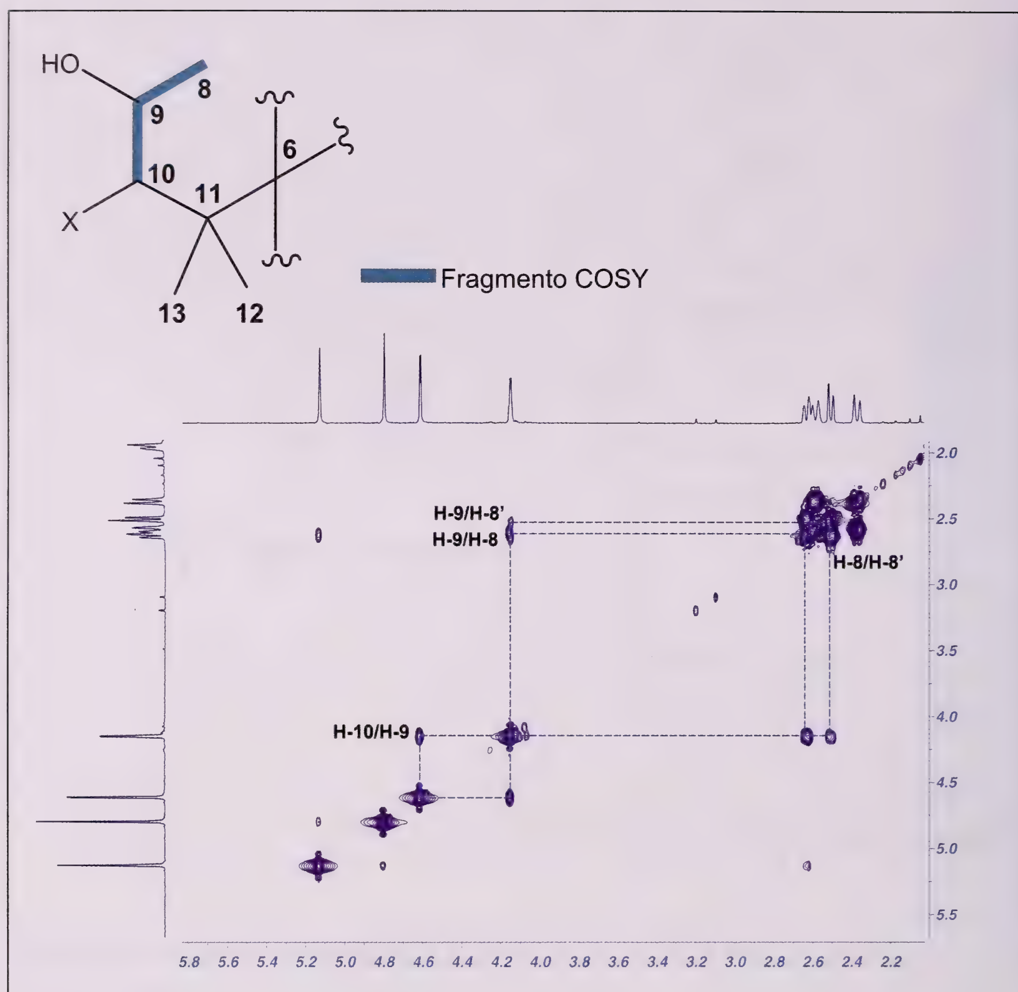


Figura 6.- Corte del experimento COSY del compuesto 1, región 2.0< δ_H<5.8 ppm. Dibujo del fragmento COSY resultante.

En el espectro HMBC, tanto H-1'/H-1 como H-4'/H-4 se conectan con dos nuevos carbonos totalmente sustituidos y localizados en la región del espectro de RMN ^{13}C propia de los dobles enlaces, C-2 (δ_C 124.1) y C-3 (δ_C 128.1).

La elucidación estructural del compuesto 1 concluye con la asignación del grupo metilo restante a δ_C 19.5, como C-15 en función de los acoplamientos tipo HMBC observados entre su señal de protón singlete a 1.73 y los carbonos C-2, C-3 y C-4 (Fig. 10).

El *anillo B* se define así como un ciclohexeno donde el doble enlace totalmente sustituido se sitúa entre las posiciones C-2 y C-3 portando respectivamente un heteroátomo y el metilo C-15 en esas posiciones.

La identificación y localización de los heteroátomos en las posiciones C-2, C-9 y C-10 se realiza de acuerdo con los datos de masas y los valores de desplazamiento químico de RMN. Éstos concuerdan con la presencia de un bromo en C-10, un hidroxilo en C-9 y un cloro en C-2.

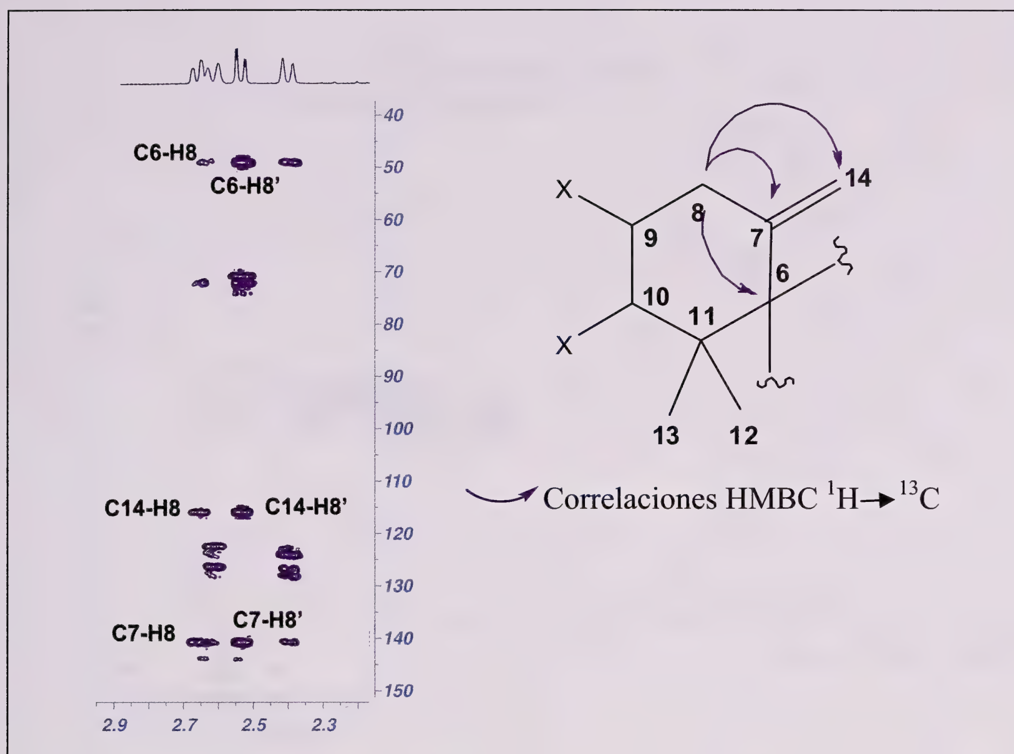


Figura 7.- Corte del experimento HMBC del compuesto 1, región 2.3< δ_H<2.9 40< δ_C<150 ppm. Representación de las correlaciones HMBC.

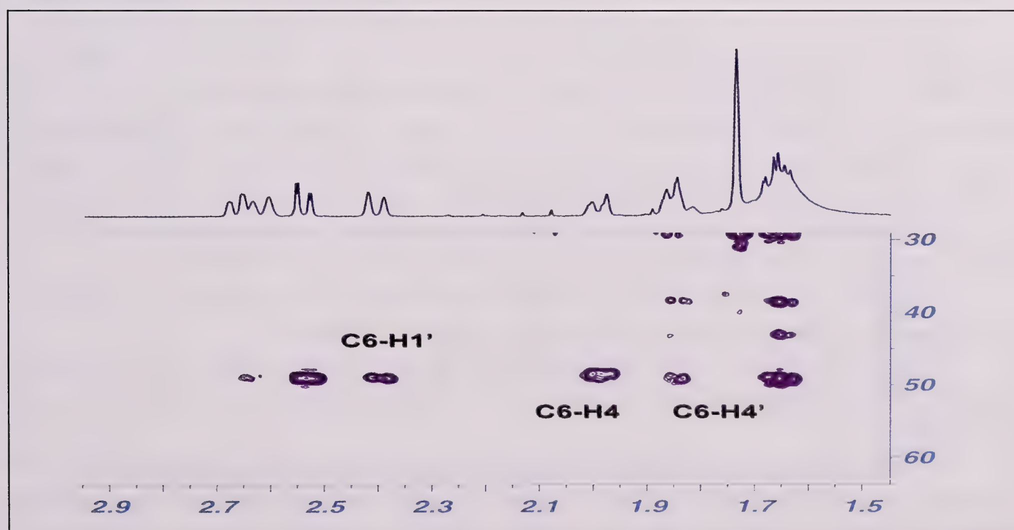


Figura 8.- Corte del experimento HMBC del compuesto 1, región 1.5< δ_H<2.9 30< δ_C<60 ppm.

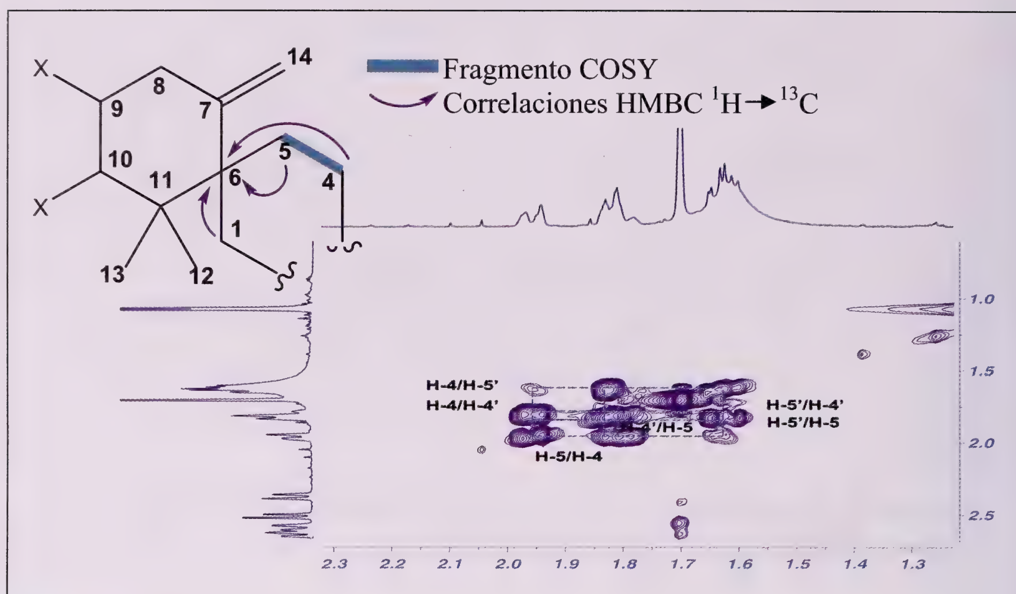


Figura 9.- Sección del experimento COSY del compuesto 1, región $1.3 < \delta_H < 2.3$. Dibujo de las correlaciones COSY y HMBC relativas a esa zona.

La estructura plana coincide con la del compuesto conocido elatol [25, 41] confirmando que se trata de la misma sustancia al determinar que, estereoquímicamente es idéntico en base a la interacción tipo ROE observada entre H-10, tanto con el metino H-9 como con los protones del metileno H_2-5, así como por el signo de la rotación óptica (Fig. 11).

Compuesto 2: isoobtusol

El compuesto 2 fue aislado como un aceite incoloro, $[\alpha]^{25}_{D} = +69.7$ (*c* 0.07 $CHCl_3$). El espectro de masas de alta resolución mostró un pico a *m/z* 415.9748 (calc. 415.9754), 413.9760 (calc. 413.9775) y 411.9776 (calc. 411.9804) con intensidad relativa 7, 10, 4, que corresponde a la fórmula molecular $C_{15}H_{23}OBr_2Cl$ y que indica tres grados de insaturación.

La interpretación de los datos de los experimentos COSY, HSQC, y HMBC, permitió realizar las asignaciones de las señales de RMN ^{1}H y ^{13}C, tal como se recoge en la Tabla 2.

De sus datos espectroscópicos se deduce que posee el mismo esqueleto carbonado que el compuesto 1 diferenciándose únicamente en el anillo B. Así se observa:

La ausencia del doble enlace totalmente sustituido entre las posiciones C-2 y C-3, lo que concuerda con un grado menos de insaturación en la molécula.

El metileno H-1/H-1' ya no se presenta como un sistema aislado sino que aparece acoplado en el experimento de COSY con un nuevo grupo metino en α a un cloro a δ_H 4.47 (H-2) (Fig. 12).

Los cambios en los desplazamientos químicos: del metilo 15 (δ_H 1.73 y δ_C 19.5 en el compuesto 1 *vs* δ_H 1.95 y δ_C 32.8 en el compuesto 2), al no estar ahora situado sobre un doble enlace sino sobre un carbono cuaternario donde se ha adicionado un átomo de bromo; del propio carbono cuaternario C-3 (δ_C 128.1 *vs* δ_C 71.1); y del metileno 4 que ha dejado de ser

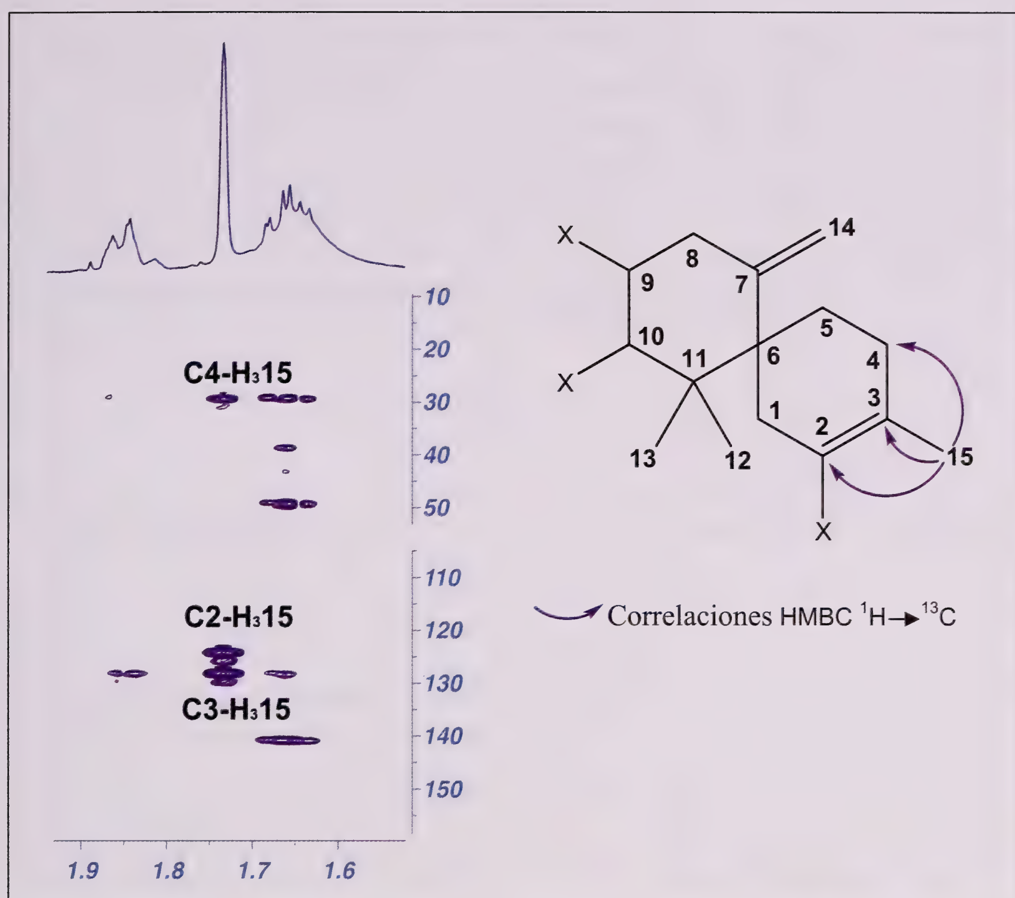


Figura 10.- Corte del experimento HMBC del compuesto 1, región 1.6< δ_H<1.9, 10< δ_C<50 - 110< δ_C<150 ppm. Dibujo de las correlaciones HMBC de H_3-15.

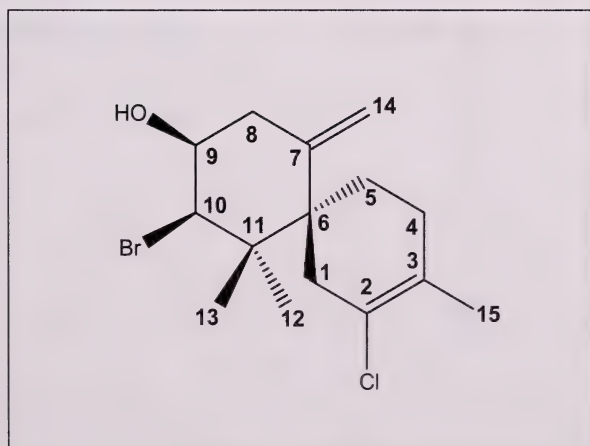


Figura 11.- Compuesto 1 elatol.

nº C	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplicidad	*J* (Hz)
1	33.9	2.83/3.13	dd/ bd	3.4,15.5/15.5
2	65.2	4.47	m	
3	71.1			
4	33.2	1.88/2.27	m/m	
5	25.6	1.81/2.08	m/m	
6	44.0			
7	148.1			
8	39.4	2.46/2.73	bd/dd	11.9/11.9;12.1
9	69.8	3.69	m	
10	76.2	4.45	d	1.9
11	43.7			
12	25.6	1.09	s	
13	24.9	1.37	s	
14	113.8	4.95/5.20	bs/bs	
15	32.8	1.95	bs	

Tabla 2.- Datos de RMN del compuesto 2 ($CDCl_3$).

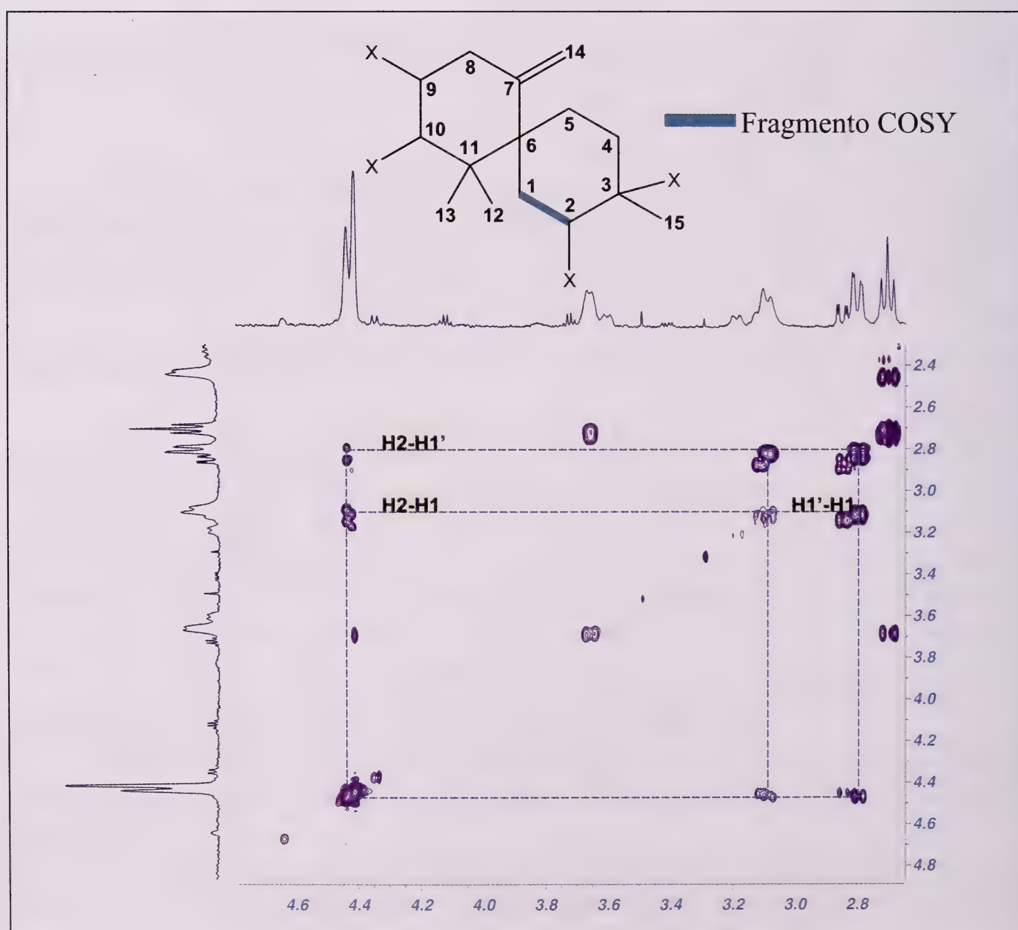


Figura 12.- Corte del experimento COSY del compuesto 2, región 2.4<δ_H<4.8 ppm. Dibujo del nuevo sistema de spin.

alílico (δ_H 1.84/1.99 y δ_C 29.4 en el compuesto 1 *vs* δ_H 1.88/2.27 y δ_C 33.2 en el compuesto 2) (Figs. 13 y 14).

En función de estos datos se concluye que la estructura plana del compuesto 2 es tal como se muestra en la Fig. 15 y coincide con la del isoobtusol [15, 49] y *allo*-isoobtusol [19]. La comparación de los desplazamientos químicos de carbono en C-2 y C-3 del compuesto aislado con los datos publicados de estas dos sustancias (Tabla 3), la ausencia de la correlación ROE clave entre el metilo H_3-15 y el protón H-2 típica de la disposición *trans*-diaxial de los átomos cloro y bromo en el *allo*isoobtusol (Fig. 16), y el estudio del signo de la rotación óptica ($[\alpha]_D$= +69.7 para el compuesto 2, $[\alpha]_D$= +33 para el isoobtusol, y $[\alpha]_D$= -33.8 para el *allo*-isoobtusol) permite afirmar que el compuesto 2 es el isoobtusol.

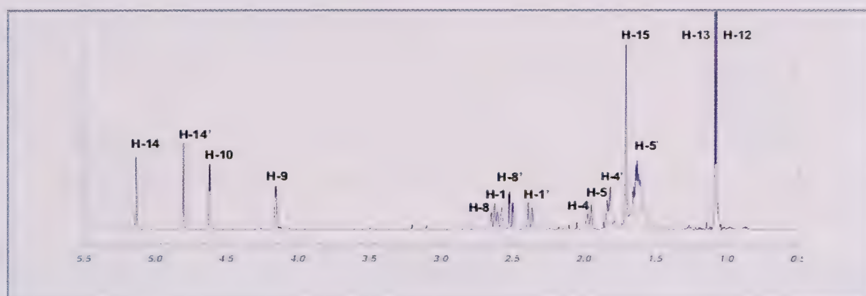


Figura 13.- Espectro de RMN ^{1}H del compuesto 1.

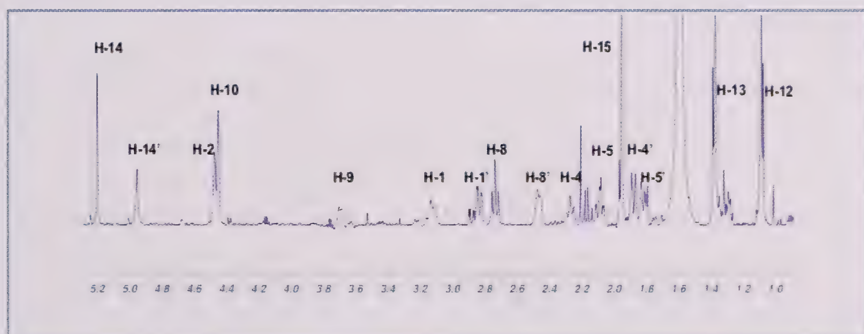


Figura 14.- Espectro de RMN ^{1}H del compuesto 2.

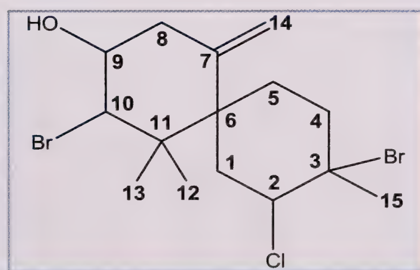


Figura 15.- Estructura plana del compuesto 2.

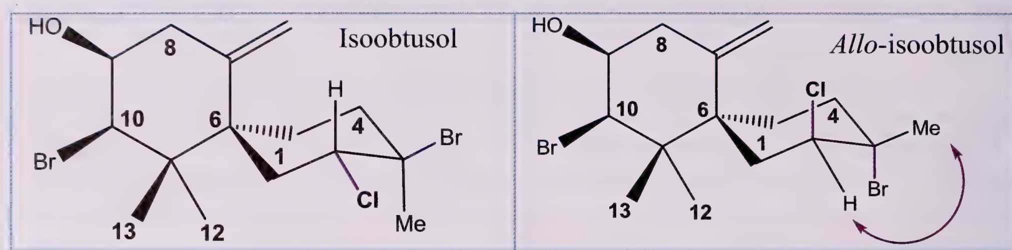


Figura 16.- Comparación de la configuración espacial del isoobtusol y el *allo*-isoobtusol. Correlación ROE entre H_3-15 y H-2.

nº C	Compuesto 2	Isoobtusol	*Allo*-isoobtusol
C-2	65.2	65.2	57.1
C-3	71.1	72.2	73.2

Tabla 3.- Comparación de los δ_C C-2 y C-3 del compuesto 2 con los datos publicados del isoobtusol y el *allo*-isoobtusol.

Bioactividad del elatol y del isoobtusol

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de bioactividad frente a las líneas celulares tumorales recogidas en las Tablas 4 y 5, indicaron la actividad antiproliferativa de ambos compuestos.

Elatol	Línea celular	GI_{50}
	A2780	4.6×10^{-7}
	HBL-100	8.5×10^{-7}
	HeLa	3.1×10^{-6}
	ISHIKAWA	7.4×10^{-7}
	SW1573	2.2×10^{-6}
	WiDr	6.8×10^{-7}

Tabla 4.- Valores de GI_{50} [M] de las diferentes líneas celulares ensayadas con elatol.

Isoobtusol	Línea celular	GI_{50}
	A2780	8.2×10^{-7}
	HBL-100	7.8×10^{-6}
	HeLa	2.0×10^{-5}
	ISHIKAWA	7.8×10^{-6}
	SW1573	2.3×10^{-5}
	WiDr	5.1×10^{-6}

Tabla 5.- Valores de GI_{50} [M] de las diferentes líneas celulares ensayadas con isoobtusol.

Las moléculas aisladas fueron capaces de inhibir el crecimiento tanto de líneas celulares tumorales caracterizadas por su sensibilidad a los fármacos A2780 (ovario) como de líneas celulares resistentes WiDr (colon) [38]; sin embargo, la acción de los compuestos fue diferente. El elatol presentó valores de citotoxicidad diez veces superiores a los del isoobtusol, salvo en la línea celular más sensible A2780, caso en el que los valores de inhibición del crecimiento son similares. Estas diferencias entre el elatol y el isoobtusol podrían estar indicando una posible relación estructura-actividad, siendo el responsable de la mayor potencia del elatol el grupo clorovinil que éste posee sobre el ciclohexeno (anillo B). Esta hipótesis se hace en base a los resultados de trabajos previos, en los que se vincula la actividad antiproliferativa de compuestos alquil-cloro-dihidropirano, frente a estas líneas celulares, con la existencia de un grupo clorovinilo (Fig. 17) [23, 24, 30, 31].

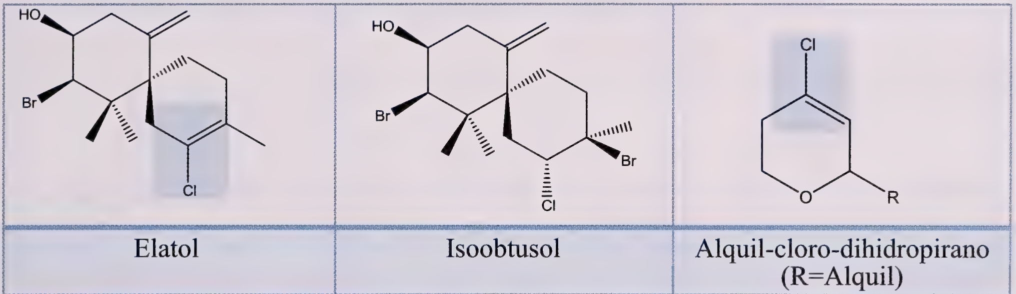


Figura 17.- Comparación del elatol e isoobtusol con la estructura general de alquil-cloro-dihidropirano citotóxico.

Por otro lado, los resultados preliminares del efecto de los compuestos sobre las distintas fases del ciclo celular, característico de cada cultivo ensayado (Tablas 6-8), reflejan la acción que los mismos estarían ejerciendo en la fase G_1 pues, en la mayoría de los casos, es en ésta en la que se observa retención del ciclo celular tras 24 horas de exposición. En todas las situaciones se advierte la disminución de la distribución celular en las fases S (exceptuando WiDr expuesta a 3 µM elatol) y G_2/M. Además, se percibe una posible relación dosis dependiente en el incremento de la tasa de muerte celular, salvo en el caso del efecto del isoobtusol a 15 µM sobre el cultivo de la línea tumoral SW1573, el cual parece ser menos letal que a 5 µM (Figs. 18-20). Estos resultados se corresponden con la acción que muchos agentes citotóxicos o dañinos del ADN muestran, ya que se caracterizan por ser capaces de detener a las células en alguna de las fases de su ciclo y de inducir la muerte celular por apoptosis [23].

HBL-100	Live SC	G1	S	G2/M	Muerte
Control	72.1	42.6	13.8	15.4	4.5
Elatol (1 µM)	66.7	47.8	6.6	11.9	4.8
Elatol (3 µM)	53.7	34.3	3.9	15.6	17.2
Isoobtusol (5 µM)	67.2	45.8	9.2	12.0	5.0
Isoobtusol (15 µM)	65.2	45.5	4.2	15.1	8.8

Tabla 6.- Datos del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de HBL-100.

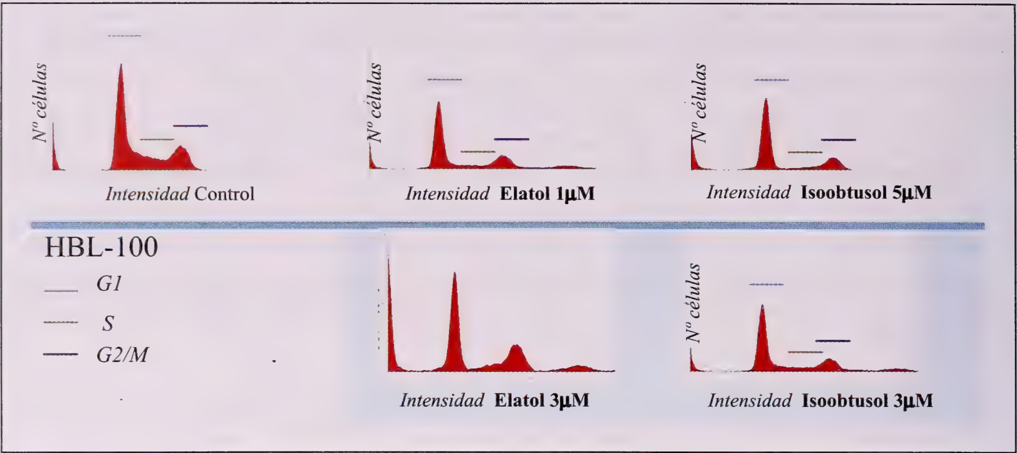


Figura 18.- Histogramas del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de HBL-100.

SW-1573	Live SC	G1	S	G2/M	Muerte
Control	83.8	47.7	16.7	19.2	4.1
Elatol (1µM)	73.9	45.1	11.7	16.7	4.8
Elatol (3 µM)	73.1	53.0	7.2	12.8	7.1
Isoobtusol (15 µM)	78.3	49.9	10.8	15	5.1
Isoobtusol (45 µM)	75.4	52.3	8.8	14.1	4.7

Tabla 7.- Datos del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de SW1573.

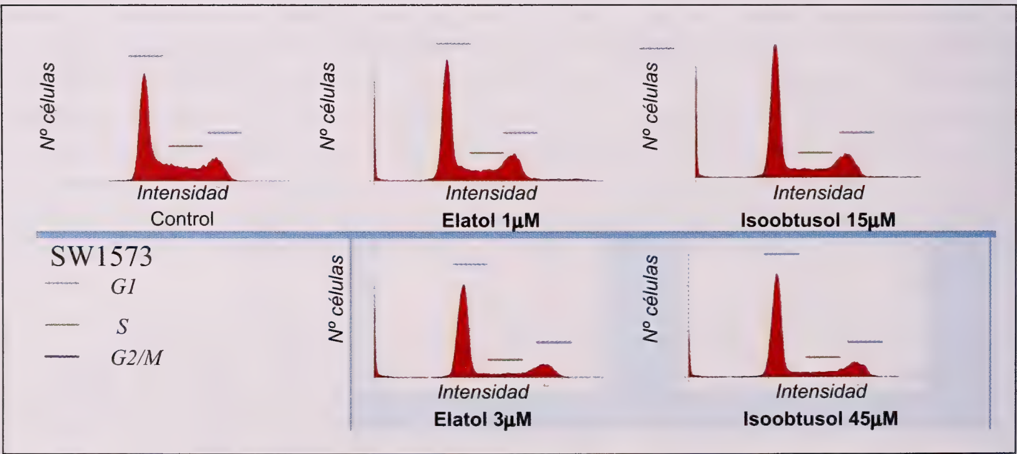


Figura 19.- Histogramas del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de SW1573.

WiDr	Live SC	G1	S	G2/M	Muerte
Control	85.1	48.1	17.3	19.1	1.5
Elatol (1μM)	76.5	55.2	6.4	14.2	3.4
Elatol (3 μM)	74.4	53.8	7.1	12.7	5.2
Isoobtusol (5 μM)	76.0	54.2	7.5	13.7	3.4
Isoobtusol (15 μM)	74.3	54.0	5.4	14.4	4.4

Tabla 8.- Datos del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de WiDr.

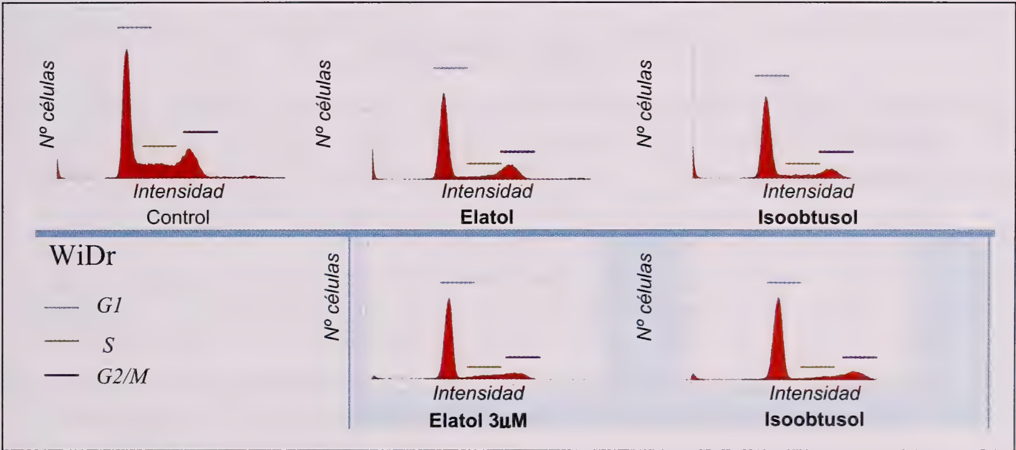


Figura 20.- Histogramas del efecto de los compuestos aislados sobre el ciclo celular de WiDr.

5. CONCLUSIONES

El estudio químico preliminar de las muestras de *Laurencia dendroidea* recolectadas en el Puerto de la Cruz en septiembre de 2009, reflejó que los compuestos halogenados de naturaleza terpénica, elatol e isoobtusol, son metabolitos secundarios mayoritarios de las algas que conforman las poblaciones de las Islas, tal y como ya se había citado en los estudios realizados sobre *L. majuscula* de Gran Canaria y del sur de La Gomera [28].

En el estudio preliminar de bioactividad, tanto el elatol como el isoobtusol, mostraron una notable actividad antiproliferativa frente a líneas celulares de tumores sólidos (A2780, HBL-100, HeLa, ISHIKAWA, SW1573 y WiDr). El elatol presentó mayor citotoxicidad que el isoobtusol, hecho que podría estar relacionado con la existencia del grupo clorovinilo presente en el ciclohexeno del elatol. Este grupo funcional se ha revelado como esencial para la actividad frente a estas líneas celulares en una serie de 2-alquil-4-cloro-5,6-dihidro-piranos.

El análisis preliminar del efecto que el elatol y el isoobtusol ejercen sobre las fases del ciclo celular característico de los cultivos ensayados, evidenció cierto poder de retención del ciclo celular en la fase G1, tras 24 horas de exposición frente a los mismos. Característica que se podría comparar con la de numerosos agentes citotóxicos o lesivos del ADN.

6. AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Lcdo. Adrián Gutiérrez por su ayuda en el trabajo de laboratorio. Este trabajo formó parte de la memoria de investigación final de Master Oficial de Biotecnología de la Universidad de La Laguna Mención de Calidad: MCD 2007-000111 de María Machín Sánchez. Ha sido, en parte, financiado por los proyectos del MEC-Ministerio de Educación y Ciencia-(CGL2007-60635/BOS; CTQ2008-06754-C04-01/PPQ). Los ensayos de bioactividad fueron llevados a cabo por C. Ríos-Luci, L. G. León y J. M. Padrón (BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González, Universidad de La Laguna).

7. BIBLIOGRAFÍA

[1] BLUNT, J.W., COPP, B. R., HU, W. P., MUNRO, M. H. G., NORTHCOTE, P.T. & PRINSEP, M. R. 2010. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 27: 165-237.

[2] BUENO D., VIANNA, S. & CRESPO, R. 2006. Quantitative GC-ECD Analysis of Halogenated Metabolites: Determination of Surface and Within-Thallus Elatol of *Laurencia obtusa*. *J. Chem. Ecol.* 32: 835-843.

[3] BUTLER, A. & CARTER-FRANKLIN, J. N. 2004. The role of Vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine products. *Nat. Prod. Rep.* 21: 180-188.

[4] CASSANO V., METTI, Y. & MILLAR A.J. K., GIL-RODRIGUEZ M. C., SENTIES A., DÍAZ-LARREA J., OLIVEIRA M. & FUJII M.T. 2010 sometido. Redefining the taxonomic status of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil and the Canary Islands. *Eur. J. Phycol.*

[5] CARTER, G. T., RINEHART, JR., LI, K. L., KUENTZEL, S. L. & CONNOR, J.L. 1978. Bromiated indoles from *Laurencia brongniartii*. *Tetrahedron Letters*. 21: 2299-2302.

[6] CARTER-FRANKLIN, J. N, PARRISH, J. D., TSCHIRRET-GUTH, R. A., LITTLE, R. D. BUTLER, A. J. 2003.Vanadium Haloperoxidase-Catalyzed Bromination and Cyclization of Terpenes. *Am. Chem. Soc* 125, 3688-3689.

[7] CARTER-FRANKLIN, J. N. & BUTLER, A. 2004. Vanadium Bromoperoxidase-Catalyzed Biosynthesis of Halogenated Marine Natural Products. J. Am. Chem. Soc. 126: 15060-15066.

[8] DA GAMA, B.A.P., PEREIRA, R.C., SOARES, A.R., TEIXEIRA, V.L. & YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison between laboratory and field assays. *Biofouling* 19: 161-169.

[9] DE NYS, R., LEYA, T., MAXIMILIEN, R., AFSAR, A., NAIR, P. S. R., & STEINBERG, P. D. 1996. The need of standardized broad scale bioassay testing: A case stady using the red algae *Laurencia rigida*. *Biofouling* 10: 213-224.

[10] DEV, S. & KOUL, O. 1997. Insecticides of Natural Origin. Harwood Academic Publishers, Australia, pp. 341-344.

[11] DÍAZ-MARRERO, A.R., BRITO, I., DE LA ROSA, J.M., D'CROZ, L.D., FABELO, O., RUIZ-PÉREZ, C., DARIAS, J. & CUETO, M. 2009. Novel Lactone chagrene-derived metabolites from *Laurencia majuscula*. *Eur. J. Org. Chem.* 1407-1411.

[12] EL SAYED, K.A., DUNBAR, D.C., PERRY, T.L., WILKINS, S.P., HAMANN, M.T., GREENPLATE, J.T. & WIDEMAN, M.A. 1997. Marine natural products as prototype insecticidal agents. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2735-2739.

[13] ERICKSON, K.L. 1983. Constituents of *Laurencia*. En: Scheuer, P.J. (Ed.), Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives; vol. 5. Academic Press, New York. pp. 131-257.

[14] GARBARY, D.J. & HARPER, J.T. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie, Algologie* 19: 185-200.

[15] GONZÁLEZ A. G., MARTÍN J. D. & MARTÍN V. S. 1979. X Ray of Sesquiterpene constituents of the algae *L. obtusa* leads to structure revision. *Tetrahedron Letters.* 29: 2717-2718.

[16] GRANADO, I. & CABALLERO, P. 1995. Chemical defense in the seaweed *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Sci. Mar.* 59: 31-39.

[17] GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M. 2010. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [acceso junio 2010: http://www.algaebase.org.]

[18] HAY, M.E., FENICAL, W. & GUSTAFSON, K. 1987. Chemical defense against diverse coral reef herbivores. *Ecology*. 68: 1581-1591.

[19] JUAGDAN E. G., KALIDINDI R. & SCHEUER P. 1997. Two New Chamigranes From an Hawaiian Red Alga, *Laurencia cartilaginea. Tetrahedron*. 53 (2): 521-528.

[20] KÖNIG, G. M., & WRIGHT, A. D. 1997. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane of the marine alga *Laurencia obtusa*. *PLanta Medica*. 63: 186-187.

[21] KURATA, K., KAWAGUCHI, S., TAKAHASHI, Y., OKAMOTO, K., & SUZUKY, M. 1998. Diterpenoid feeding-deterrents from Laurencia satoi. *Phytochemistry*. 47: 363-369.

[22] LAMOUROUX, J.V.F. 1813. Essai sur les genres de la famille des Thallassiophytes non articulées. *Annales du Muséum d'Histoire Naturelle* (Paris) 20: 21-47, 115-139, 267-293, pls. 7-13.

[23] LEÓN, L.G., CARBALLO, R. M., VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., MARTÍN, V. S., PADRÓN J. I. & PADRÓN J. M. 2007a. Antiprolifertive activity of 2-alkyl-4-halopiperidines and 2-alkyl-4-halo-1,2,5,6-tetrahydropyridines in solid tumor cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17: 2681-2684.

[24] LEÓN, L.G., MIRANDA P. O., MARTÍN, V. S., PADRÓN J. I. & PADRÓN J. M. 2007b. Antiprolifertive activity of 4-chloro-5,6-dihydro-2H-pyrans. Part 2: Enhancement of drug cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 17: 3087-3090.

[25] LHULLIER, C., DONNANGELO A., CARO M., PALERMO J. A., ANTUNESHORTA P., FALKENBERG M. & SCHENKEL E. P. 2009. Isloation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatabily to the sea urchin *Echinometra lucunter. Biochemical Systematics and Ecology*. 37: 254-259.

[26] MACHÍN-SÁNCHEZ, M., AYLAGAS, E. & GIL-RODRIGUEZ, M.C. 2010, aceptado. Revisión del género *Laurencia* en las Islas Canarias. I. Acerca de *Laurencia dendroidea* y *L. majuscula* (Ceramiales, Rhodomelaceae). *Vieraea* 39.

[27] MARTÍN-LESCANNE, J., F. ROUSSEAU, B. DE REVIERS, C. PAYRI, A. COULOUX, C. CRUAUD, C. & L. LE GALL . (2010). Phylogenetic analyses of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae, Ceramiales) support recognition of five genera: *Chondrophycus, Laurencia, Osmundea, Palisada* and *Yuzurua* stat. nov. *European Journal of Phycology* 45(1): 51-61.

[28] MASUDA, M., KOGAME K., ARISAWA S. & SUZUKI, M. 1998. Morphology and halogenated secondary metabolites of three Gran Canaria species of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Botanica Marina.* 41: 265-277.

[29] MCDERMID, K. 1988. Section V. *Laurencia* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Introtuction. pp. 221-229. En: I.A. Abbott (ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference to some Pacific and Caribbean Species.* Vol. II. California Sea Grant College Program, La Jolla. California.

[30] MIRANDA, P. O., PADRÓN, J. M., PADRÓN, J. I., VILLAR, J. & MARTÍN V. S. 2006 A. Prins-Type Synthesis and SAR Study of Cytotoxic Alkyl Chloro Dihydropyrans. *ChemMedChem.* 1: 323-329.

[31] MIRANDA, P. O., LEÓN, L. G., MARTÍN V. S., PADRÓN, J. I. & PADRÓN, J. M. 2006 b. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 16: 3135-3138.

[32] NAM, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal Applied Phycology* 18: 679-697.

[33] NAM, K.W. 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22: 53-55.

[34] NAM, K.W., MAGGS, C.A. & GARBARY, D.J. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycología* 33: 384-395.

[35] NEDELCU, A.M. 2006. Evidence for p53-like-mediated stress responses in green algae. FEBS Lett. 580 (13): 3013-3017.

[36] OBOTA, Y. & FUKUSHI, S. 1953. *J. Agr. Chem. Soc. Jpn.* 7: 3-31.

[37] PEREIRA, R.C., DA GAMA, B.A.P., TEIXEIRA, V.L. & YONESHIGUE-VALENTIN, Y. 2003. Ecological roles of natural products from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa. Braz. J. Biol.* 63(4): 665-672.

[38] PIZAO, P.E., PETERS, G.J., ARK-OTTE, J., SMETS, L.A., SMITSKAMP-WILMS, E., WINOGRAD, B., PINEDO, H. M. & GIACCONE, G. 1993. *Eur. J. Cancer. 29A*, 1566.

[39] SALGADO, L.T., VIANA, N.B., ANDRADE, L.R., LEAL, R.N., DA GAMA, B.A.P., ATTIAS, M., PEREIRA, R.C. & AMADO FILHO, G.M. 2008. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa.J. Structural Biology.* 162: 345-355.

[40] SEGOVIA, M,. HARAMATI, L., BERGES, J. A., & FALKOWSKI, P.G. 2003. Cell death in the unicelular chlorophyte Dunaliella tertiolecta. A hypothesis on the evolution of apoptosis in higher plants and metazoans. Plant Physiol. 132 (1): 99-105.

[41] SIMS, J.J., LIN, G.H.I. & WING, R.M. 1974. Marine natural products X[1] Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga *Laurencia elata. Tetrahedron Letters*, 39: 3487-3490.

[42] SUZUKI, M. & VAIRAPPAN, C.S. 2005. Halogenated secondary metabolites from Japanese species of the red algal genus *Laurencia. (Rhodomelaceae, Ceramiales). Curr. Top.Phytochem.* 7: 1-4.

[43] SUZUKI, M., TAKAHASHI, Y., NAKANO, S., ABE, T., MASUDA, M., OHNISHI, T., NOYA, Y. & SEKI, K. 2009. An experimental approach to study the biosynthesis of brominated metabolites by the red algal genus *Laurencia. Phytochemistry.* 70: 1410-1415.

[44] VAIRAPPAN, C.S., DAITOH, M., SUZUKI, M., ABE, T. & MASUDA, M. 2001a. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry*. 58: 291-297.

[45] VAIRAPPAN, C.S., SUZUKI, M., ABE,T. & MASUDA, M. 2001b. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry.* 58: 517-523.

[46] VAIRAPPAN, C.S. 2003. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula (Rhodomelaceae, Ceramiales). Biomolecular Engineering*. 20: 255-259.

[47] VAIRAPPAN, C.S, ANANGDAN, S. P., TAN, K. L. & MATSUNAGA, S. 2010. Role of secondary metabolites as defense chemicals against ice-ice disease bacteria in bio-fouler at carrageenophyte farms. *J. Appl. Phycol*. 22: 305-311.

[48] VILTER, H. 1983. Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxida ses from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. *Botanica Marina*. 26: 429-435.

[49] WESSELS M., KÖNIG G. M. & WRIGHT A. D. 2000. New Natural Product Isolation and Comparison of the Secondary Metabolite Content of Three Distinct Samples of the Sea Hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. *Journal of Natural Products*. Vol. 63, No. 7.

[50] YOUNG, D. N., HOWARD, B. M. & FENICAL, W.1980. Subcellular localization of brominated secondary metabolites in the red alga *Laurencia snyderae*. *J. Phycol*. 16: 182-185.